

Die farbenfrohe Welt der Prodiginine – Neue Enzyme für die Synthese bioaktiver Naturstoffderivate

Hannah Ursula Clara Braß



**Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich**

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

Die farbenfrohe Welt der Prodiginine – Neue Enzyme für die Synthese bioaktiver Naturstoffderivate

Hannah Ursula Clara Braß

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 40

ISBN 978-3-95806-523-9

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	VII
2	Kurzbeschreibung	1
3	Abstract	3
4	Einleitung	5
4.1	Einführung in die Thematik	5
4.2	Zielsetzung	8
5	Kenntnisstand	11
5.1	Naturstoffe – Klassen der Sekundärmetabolite	11
5.2	Prodiginine – leuchtend rote Sekundärmetabolite	13
5.2.1	Historie der Prodiginine	13
5.2.2	Strukturaufklärung von Prodigiosin (1a) und Struktur von Prodigininen	14
5.2.3	Biologische Aktivität	19
5.3	Tambjamine	23
5.3.1	Struktur von Tambjaminen	23
5.3.2	Biologische Aktivität	25
5.4	Biosynthese von Prodigininen und Tambjaminen	29
5.4.1	Übersicht über die Biosynthese von Prodigininen und Tambjaminen	29
5.4.2	Aufklärung der Biosynthese von Prodigininen	30
5.4.3	Biosynthese von 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (2 , MBC)	32
5.4.4	Biosynthese von 2-Methyl-3- <i>n</i> -amylpyrrol (3a , MAP)	34
5.4.5	Biosynthese von Undecylpyrrol (27a , 2-UP)	34
5.4.6	Biosynthese von Dodec-3-en-1-amin (28a , DDA)	36
5.4.7	Kondensation zu Prodigininen und Tambjaminen	37
5.4.8	Zyklisierungen	38
5.5	Kondensationsenzyme	39
5.5.1	Kondensationsenzyme mit MAP (3a) als Edukt – PigC und HapC	41
5.5.2	Kondensationsenzyme aus <i>Streptomycetaceae</i> mit 2-UP (27a) als Edukt – RedH und Homologe	44

5.5.3	Kondensationsenzyme aus <i>Pseudoalteromonadaceae</i> mit DDA (28a) als Edukt – TamQ und TreaP	45
5.6	Heterologe Produktion von Prodigiosin (1a) und Derivaten in <i>P. putida</i> KT2440	45
5.6.1	Produktion von Prodigiosin (1a) in <i>P. putida</i> KT2440 – Biosynthese	45
5.6.2	Produktion von Prodigiosin (1a) Derivaten in <i>P. putida</i> KT2440 – Mutasyntese	47
5.6.3	Extraktion und Reinigung von Prodigininen aus <i>P. putida</i>	48
5.7	Biomimetische Synthesen von Prodigininen	49
5.7.1	Synthese von MBC (2) und Boc-MBC (75)	51
5.7.2	Synthesen der Monopyrrole	53
5.7.3	Kondensationsreaktion zu Prodigininen	56
6	Ergebnisse und Diskussion	59
6.1	Synthese von Vorläuferverbindungen und Referenzprodukten	59
6.1.1	Synthese von Vorläuferverbindungen	59
6.1.1.1	Pyrrolsynthesen	59
6.1.1.2	Synthese von DDA (28a)	63
6.1.2	Synthese von Referenzprodukten	63
6.2	Neue Kondensationsenzyme – neue Prodiginine?	66
6.2.1.1	Suche nach neuen putativen Kondensationsenzymen	66
6.2.1.2	Genclusteranalyse von Prodiginin und Tambjamin produzierenden Organismen	67
6.2.2	Klonierung und Expression ausgewählter Kondensationsenzyme	75
6.2.2.1	Anzucht und Genomisolierung von <i>Streptomycetaceae</i> und <i>Pseudoalteromonadaceae</i>	76
6.2.2.2	Klonierung der für Kondensationsenzyme codierenden Gene aus <i>Streptomycetaceae</i>	77
6.2.2.3	Genexpression und Aktivitätsassays der Kondensationsenzyme aus <i>Streptomycetaceae</i>	82
6.2.2.4	Genexpression und Aktivitätsassays der Kondensationsenzyme aus <i>Pseudoalteromonadaceae</i>	89
6.2.2.5	Initiale Aktivitätsassays mit Kondensationsenzymen aus <i>Pseudoalteromonadaceae</i>	91
6.2.3	Substratspektren neuer Kondensationsenzyme	94
6.2.3.1	Bestimmung von Extinktionskoeffizienten zur Quantifizierung von Prodigininen	94
6.2.3.2	Bestimmung der Substratspektren der Kondensationsenzyme	96
6.2.3.3	Erweiterung der Substratspektren – Zugang zu Undecylprodigiosin (9a) und Derivaten	100

6.2.3.4	Regioselektivität der elektrophilen aromatischen Substitution an Pyrrolderivaten.....	102
6.2.3.5	Fünfgliedrige Heteroaromaten und Indole 102	105
6.2.4	Kinetische Untersuchungen der Kondensationsenzyme	110
6.2.4.1	Kinetische Untersuchung mit 2,3-dialkylierten Pyrrolen	110
6.2.4.2	Kinetische Untersuchung mit 2-alkylierten Pyrrolen	117
6.2.5	Interaktionen der Kondensationsenzyme PigC und TamQ mit der Zellmembran	120
6.2.6	Biokatalyse zur Synthese von Prodigininen	126
6.2.7	Synopsis des Kapitels	128
6.3	Biosynthetische Produktion von Prodigiosin (1a)	129
6.3.1	Optimierung der Kultivierungsparameter zur Erhöhung der Prodigiosin (1a) Produktion.....	129
6.3.2	Fermentation des Stammes <i>P. putida</i> pig-r2	139
6.3.3	Synopsis des Kapitels	141
6.4	Bioaktivität von Prodigininen.....	142
6.4.1	Antibiotische Aktivität von Prodigininen	142
6.4.1.1	Antibiotische Wirkung gegenüber biotechnologisch relevante Organismen	142
6.4.1.2	Antibiotische Aktivität gegenüber fakulativ humanpathogenen Erregern	146
6.4.2	Beeinflussung der Autophagie in MCF7 Brustkrebszellen	148
6.4.3	Synopsis des Kapitels	154
7	Zusammenfassung und Ausblick	155
7.1	Neue Enzyme für die Prodigininsynthese	155
7.1.1	Ligasen für die Prodigininsynthese	155
7.1.2	Perspektiven und Anknüpfungspunkte	158
7.2	Biosynthetische Produktion von Prodigiosin (1a) – Optimierung der Kultivierungsparameter	170
7.3	Bioaktivität von Prodigininen.....	171
8	Experimentalteil	176
8.1	Allgemeines.....	176
8.1.1	Geräte und Software.....	176
8.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	179
8.1.3	Chemikalien.....	179
8.1.4	Enzyme	179

8.1.5	Oligonukleotide und Plasmide	180
8.1.6	Mikroorganismen	184
8.2	Synthesevorschriften.....	185
8.2.1	Allgemeine chemische Methoden.....	185
8.2.1.1	Lösungsmittel	185
8.2.1.2	Reaktionsdurchführung, Reaktionskontrolle und präparative Chromatographie ..	185
8.2.1.3	Massenspektrometrie.....	185
8.2.1.4	NMR-Spektroskopie und Quantitative NMR-Spektroskopie	186
8.2.1.5	Infrarot(IR)-Spektroskopie	186
8.2.1.6	LC-MS Analyse	187
8.2.1.7	Schmelzpunktbestimmung	187
8.2.2	Synthese von Pyrrolen.....	187
8.2.2.1	Vorschrift A: Synthese der 2,3-Dialkylpyrrole 3a, 3b, 3f, 3h, 3i, 57a, 57c, 57e, 57f und der zyklischen 2,3-alkylierten Pyrrole 82a, 82e	189
8.2.2.2	Vorschrift B: Synthese der 3-Alkylpyrrole 56a–56i	195
8.2.2.3	Vorschrift C: Synthese der 2-Alkylpyrrole 27a, 27c–27g	201
8.2.3	Synthese von Boc-MBC (75) und MBC (2)	205
8.2.4	Synthese von Prodigininen	208
8.2.5	Synthese von Indolprodigiosin (103a)	217
8.2.6	Synthese von Dodec-3-en-1-amin (28a, DDA).....	218
8.3	Molekularbiologische Methoden.....	221
8.3.1	Primerdesign	221
8.3.2	PCR-Methoden	221
8.3.2.1	Kolonie-PCR	222
8.3.2.2	Test-PCR.....	222
8.3.2.3	<i>QuikChange</i> ®-PCR.....	222
8.3.2.4	<i>Nested</i> PCR.....	223
8.3.2.5	<i>Overlap Extension</i> PCR.....	224
8.3.3	Isolierung von DNA.....	225
8.3.3.1	Isolierung von Plasmid DNA	225
8.3.3.2	Isolierung genomischer DNA	225
8.3.4	Restriktionsverdau und Ligation.....	226
8.3.5	Agarosegelelektrophorese	226
8.3.6	Gelelution aus dem Agarosegel.....	227

8.3.7	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	227
8.3.8	<i>Gibson Assembly</i> ®	227
8.3.9	DNA-Sequenzierung	228
8.4	Mikrobiologische Methoden.....	228
8.4.1	Anzucht und Lagerung von Mikroorganismen	228
8.4.1.1	Medien und Medienzusätze.....	228
8.4.1.2	Kultivierungsbedingungen.....	232
8.4.1.3	Herstellung von Glycerinkulturen zur langfristigen Lagerung von Mikroorganismen	233
8.4.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	234
8.4.3	Hitzeschocktransformation kompetenter Zellen	234
8.5	Proteinbiochemische Methoden	235
8.5.1	Zellaufschluss	235
8.5.2	SDS-PAGE	235
8.5.3	Isolierung der Membranfraktion.....	236
8.5.4	Proteinisolierung.....	236
8.5.4.1	Proteinisolierung <i>via</i> Ablösung von der Zellmembran	237
8.5.4.2	Proteinisolierung <i>via</i> IMAC.....	237
8.5.4.3	Entsalzen, Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	238
8.5.5	Abschätzen der Proteinmenge in Membranfraktion <i>via</i> Densitometrie	239
8.5.6	Kondensationsenzym <i>in vitro</i> Assay	240
8.5.7	<i>Michaelis-Menten</i> -Kinetik	241
8.6	Spezieller Experimentalteil	243
8.6.1	Biokatalyse zur Synthese von Prodigininen	243
8.6.2	Biotransformation von Undecylprodigiosin (9a).....	244
8.6.3	Toxizitätsassays mit biotechnologisch relevanten Organismen	244
8.6.4	Medienoptimierung für Prodigiosin (1a) Produktion	245
8.6.5	Biosynthetische Produktion von Prodigiosin (1a)	246
8.6.6	Extraktion und Reinigung von Prodigiosin (1a).....	246
8.6.6.1	Extraktion aus PU-Würfeln	246
8.6.6.2	Extraktion aus Zellpellets	246
8.6.7	Quantifizierung von Prodigininen und Bestimmung molarer Extinktionskoeffizienten.....	247

8.6.8	Mutasyntese im präparativen Maßstab.....	248
8.6.9	Fermentation des Prodigiosin (1a) Produzenten <i>P. putida</i> pig-r2 im 1.5 L Maßstab...	248
9	Anhang.....	249
9.1	Genclusteranalysen	249
9.2	<i>In vitro</i> Assays	257
9.3	Extraktion der Kondensationsenzyme TamQ und PigC von der Zellmembran.....	259
9.4	Rohdaten der Optimierung der Kultivierungsparameter	261
9.5	Toxizitätsassays.....	265
9.6	Vektorkarten, Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	273
9.6.1	Standardexpressionsvektoren.....	273
9.6.2	Vektorkarten – Ligasen im pET28a(+) Vektor.....	274
9.6.3	Vektorkarten – Ligasen im pET32a(+) Vektor.....	293
9.6.4	Vektorkarten – Zyklen im pET28a(+) Vektor.....	299
9.6.5	Vektorkarten – Zyklen im pET32a(+) Vektor.....	301
9.7	Ausgewählte NMR-Spektren.....	304
9.8	Ausgewählte LC-MS Analytik	308
9.8.1	LC-MS Analytik der <i>in vitro</i> Assays	308
9.8.1.1	Initiale <i>in vitro</i> Assays	308
9.8.1.2	<i>In vitro</i> Assays mit 3-alkylierten Pyrrolen	315
9.8.1.3	<i>In vitro</i> Assays mit 2-alkylierten Pyrrolen	316
9.8.2	LC-MS Analytik der Biotransformation von Undecylprodigiosin (9a)	317
9.9	Eigenanteile an den veröffentlichten Publikationen dieser Arbeit.....	319
10	Literaturverzeichnis.....	321
11	Formelregister.....	342
12	Danksagung.....	347
13	Erklärung.....	349

Im Fokus dieser Arbeit steht der leuchtend rote Naturstoff Prodigiosin und die bioökonomische Generierung des Tripyrrols einschließlich neuer Derivate. Zentrale Aspekte der Untersuchungen sind das finale Kondensationsenzym der Biosynthese, die Erforschung der Bioaktivität von Prodigininen und die Verbesserung der biosynthetischen Produktion.

Das Schlüsselenzym der Prodigiosinbiosynthese weist eine gewisse Substratflexibilität auf, die eine Herstellung von Derivaten des Naturstoffs mittels Mutasyntese ermöglicht. Dennoch können einige Monopyrrole nicht von der Ligase PigC umgesetzt und in das Zielmolekül eingebaut werden. Eine systematische Suche nach PigC Homologen zeigte verschiedene putative Kondensationsenzyme auf. Zwei für Kondensationsenzyme codierende Gene aus *Tambjamine* produzierenden *Pseudoalteromonadaceae* wurden heterolog exprimiert und konnten für die biokatalytische Produktion von Prodigininen eingesetzt werden. Zusätzlich wurden diese Enzyme durch vergleichende enzymkinetische Untersuchungen und eine Analyse des Substratspektrums charakterisiert. Der Einsatz dieser Kondensationsenzyme eröffnete schließlich einen Zugang zu biokatalytisch bisher nicht adressierbaren Derivaten und ermöglichte die Anwendung in der semipräparativen Biokatalyse.

Die bereits etablierte nachhaltige Produktion von Prodigiosin unter Nutzung eines sicheren bakteriellen Prodigiosinproduzenten wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit durch systematische Untersuchungen der Kultivierungsparameter verbessert und ermöglichte eine höhere Prodigiosin Produktion.

Verschiedene Untersuchungen zur Bioaktivität von Prodigiosin und diversen Derivaten zeigte eine starke antimikrobielle Wirkung gegenüber Bakterien und Hefen sowie eine Beeinflussung der Autophagieprozesse in Brustkrebszellen, die zur Apoptose dieser Zellen führen. Zudem konnte eine Wirkung gegenüber pflanzenpathogenen Nematoden und Pilzen erforscht werden, wobei ein Teil der Pflanzenschädlinge durch Prodiginine im Wachstum inhibiert wurde.